

(12) NACH DEM VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. August 2001 (30.08.2001)

PCT

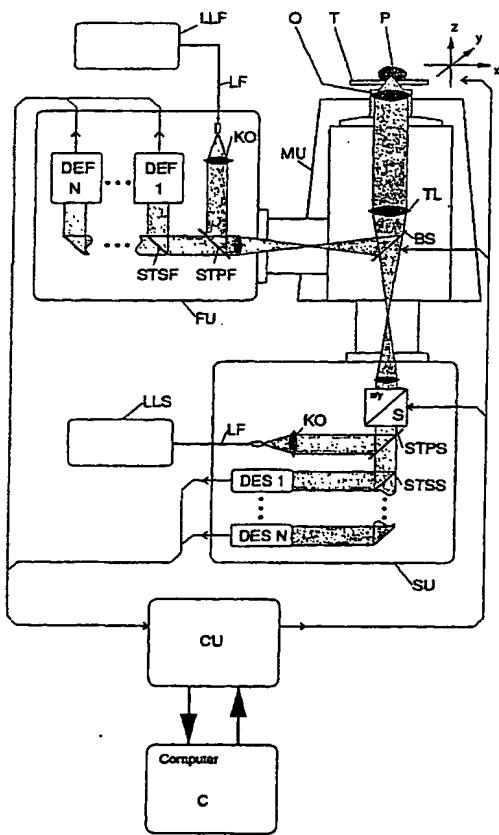
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/63259 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 21/64, G02B 21/00**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/01663**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
15. Februar 2001 (15.02.2001)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
100 08 594.6 22. Februar 2000 (22.02.2000) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **CARL ZEISS JENA GMBH [DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).**
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **JANKA, Reinhart [DE/DE]; Kernbergstr. 24, 07749 Jena (DE). JÜNGEL, Volker [DE/DE]; Judith-Auer-Str. 7, 07747 Jena (DE). JANKOWSKI, Tilo [DE/DE]; Am Wiesengrund 4, 14532 Güterfelde (DE). HECHT, Frank [DE/DE]; Am Schönblick 19, 99425 Weimar (DE).**
- (74) Gemeinsamer Vertreter: **CARL ZEISS JENA GMBH; Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).**
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): **JP, US.**

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND SYSTEM FOR DETECTING THE LIGHT COMING FROM A SAMPLE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND ANORDNUNG ZUR DETEKTION DES VON EINER PROBE KOMMENDEN LICHTES



(57) Abstract: The invention relates to a device for detecting fluorescent light comprising at least one imaging microscope unit and at least one appliance component for analyzing molecular interactions in small volumes. The invention is characterized in that: measuring points for analyzing molecular interactions are determined and selected in at least two-dimensions by using the imaging method; both the imaging microscope unit as well as the appliance component are operated with a shared control unit, and; at least the analysis result of the appliance component is graphically depicted via the control unit and a computer.

(57) Zusammenfassung: Einrichtung zur Detektion von Fluoreszenzlicht mit wenigstens einer bildgebenden Mikroskopeinheit und wenigstens einer Gerätekomponente zur Analyse molekularer Wechselwirkungen in kleinen Volumina, gekennzeichnet dadurch, daß Meßorte für die Analyse molekularer Wechselwirkung mit Hilfe des bildgebenden Verfahrens mindestens zweidimensional bestimmt und ausgewählt werden; sowohl die bildgebende Mikroskopeinheit als auch die Gerätekomponente mit einer gemeinsamen Steuereinheit betrieben werden; und über die Steuereinheit und einen Computer mindestens die Analysenergebnisse der Gerätekomponente bildhaft dargestellt werden.

WO 01/63259 A1

BEST AVAILABLE COPY



(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("*Guidance Notes on Codes and Abbreviations*") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

VERFAHREN UND ANORDNUNG ZUR DETEKTION DES VON EINER PROBE KOMMENDEN LICHTES

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) mit ihrer Realisierung in einem Mikroskopaufbau (FCM) bewährt sich insbesondere dort zur Untersuchung biomolekulärer Wechselwirkungen, wo die Untersuchungen in sehr geringen Konzentrationsbereichen kleiner 1 µMol und in Meßvolumina kleiner 10^{-14} l stattfinden¹. Solange die zu untersuchenden Proben homogen sind, spielt der Meßort nur eine untergeordnete Rolle. Im Falle von strukturierten Proben wie zum Beispiel biologischen Zellen, ist die Kenntnis bzw. die Auswahl des Meßortes aber von entscheidender Bedeutung. Diese Kenntnis über den Meßort wurde bisher über klassische Durchlicht- bzw. Auflicht-Mikroskopie gewonnen. Dazu wurde z.B. zwischen der FCS-Detektionseinheit und einer klassischen Fluoreszenzmikroskopanordnung umgeschaltet. Die Anwendung der klassischen Mikroskopie hat mehrere Nachteile. Einerseits werden dabei die Proben einen hohen Strahlungsbelastung ausgesetzt, andererseits kann der optimale Meßort im dreidimensionalen Koordinatensystem nicht mit der erforderlichen Präzision von weniger 1 µm lokalisiert werden.

Die in den Patentansprüchen sowie anhand der bildlichen Darstellungen unten beschriebene Einrichtungen und Verfahren ermöglichen vorteilhaft die Erweiterung der FCS Methode zu einem bildgebenden Verfahren (S-FCM). Damit können Aussagen zur räumlichen Verteilung der zu untersuchenden molekularen Wechselwirkungen gewonnen werden.

In Bild 1 ist eine erste vorteilhafte Anordnung dargestellt.

Mit einer Mikroskopeinheit MU (hier ein inverses Mikroskop zur Beobachtung einer auf einem in x-, y- und z-Richtung verstellbaren Tisch T befindlichen Probe P über ein unterhalb der Probe angeordnetes Objektiv O und eine Tubuslinse TL) wird mit Hilfe einer Scaneinheit SU Licht aus einer Laserlichtquelle LLS mit einer oder mehreren Wellenlängen direkt oder durch eine Lichtleitfaser LF über eine Kollimationsoptik KO sowie einem primären Strahlteiler STPS in eine Probe fokussiert. Der Scanner S erlaubt das Ablenken des Lichtstrahles in x- und y-Richtung, die Erfassung unterschiedlicher Probenschichten kann durch die vertikale Verstellung des Probentisches T oder des Objektives O erfolgen. Das von der Probe kommende Licht durchläuft wieder den Scanner S und wird mittels der sekundären Strahlteiler STSS 1...N den Detektionskanälen DES1...N zugeordnet und in elektrische Signale zur Auswertung über eine Kontrolleinheit CU in einem Computer C umgewandelt. Die

gemessenen Signale werden zur Gewinnung von Bildinformationen genutzt. Mit Hilfe einer Strahlumschaltungseinheit BS, beispielsweise eines ein- und ausschwenbaren Vollspiegels oder teildurchlässigen Spiegels wird Licht LLF aus einer Laserlichtquelle mit einer oder mehreren Wellenlängen mit Hilfe einer FCS-Einheit FU über einen primären Strahlteiler STPF in die Probe fokussiert.

Die Lichtquellen LLS und LLF können auch identisch sein und über geeignete Umlenk- und Schaltelemente in die Einheiten SU bzw. FU eingekoppelt werden.

Das von der Probe kommende Fluoreszenzlicht wird durch sekundäre Strahlteiler STSF 1...N in einen oder mehrere FCS-Detektionskanäle DEF 1... N geleitet und zur Auswertung in elektrische Signale umgewandelt und der Kontrolleinheit CU übermittelt. Die Signale werden zur FCS-Analyse verwendet.

Je nach Anzahl der installierten Detektionskanäle kann es sich um Auto-oder Kreuzkorrelationsanalysen handeln.

Hierbei werden am aktuellen Probenort beispielsweise Diffusionszeiten, Teilchenzahlen, Lebensdauern, Anteile von Komponenten ermittelt.

Die Datenaquise wird für beide Detektionseinheiten von der gleichen Kontrolleinheit CU und einem Computer C mit geeignetem Programm gesteuert. Ebenso erfolgt die Steuerung des Probentisches T, der vertikalen Objektiveinstellung des Objektives O und der Strahlumschaltungseinheit BS durch diese computergesteuerte Kontrolleinheit. Durch die Integration einer FCS-Detektionseinheit in ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop-System ergibt sich somit die Möglichkeit, auch FCS-Analyseergebnisse von Messungen an verschiedene Probenorten zu einem bildhaften Ergebnis zu kombinieren. Dadurch ergibt sich eine vorteilhafte Anordnung, die geeignet ist, FCS-Meßorte probenschonend mit hoher Genauigkeit festzulegen und andererseits auch FCS-Analysenergebnisse von Messungen an verschiedenen Orten zur Bildgebung zu verwenden.

Beispielsweise ist es vorteilhaft möglich, über unterschiedliche Farbgebung eine farbige flächenhafte oder räumliche Darstellung der Diffusionzeiten oder anderer Analysenergebnisse in Abhängigkeit vom Meßort zu erzeugen.

Weiterhin kann durch speichermäßige Zuordnung das aufgenommene FCS Bild beispielsweise als Zusatzfarbe bildlich mit kanalweise andersfarbigen LSM-Bildern verknüpft werden.

Es können auch FCS/LSM Differenz- oder Quotientenbilder oder anderweitige Kombinationen gebildet und dargestellt werden.

Die erfindungsgemäße Modifikation des Laser-Scanning-Mikroskopes und die wirkungsmäßige Verbindung mit der FCS-Geräteeinheit erfolgt durch geeignete Programme im Computer mittels einer für alle Komponenten gemeinsamen Gerätesteuereinheit. Scaneinheit, FCS-Einheit Mikroskopeinheit und Probenpositions- system sind mechanisch, optisch und elektronisch aufeinander abgestimmt und ver- koppelt.

Nach dem Scannen der Probe können Bildpunkte markiert und in die Meßposition für die FCS-Einheit gebracht und vermessen werden.

Die Auswahl der interessierenden Punkte kann automatisch nach vorgegebenen Kriterien (z.B. Raster, Strukturerfassung des Bildes) oder durch den Benutzer nach individueller Bewertung des mit der Scaneinheit aufgenommenen Bildes erfolgen.

Der vorgeschlagene Aufbau ermöglicht die gezielte Auswahl mikroskopisch kleiner Meßorte in der mit der FCS-Methode zu untersuchenden Probe. Außerdem ist es möglich, aus einer systematischen Folge von FCS-Messungen die räumliche Variation der FCS-Analysenergebnisse bildhaft zu erfassen, darzustellen und dem LSM- Bild zuzuordnen.

In Bild 2 ist eine weitere vorteilhafte Anordnung dargestellt.

Hier ist an/in einer gemeinsamen Einheit SFU eine gemeinsame Lasereinheit LLSF vorgesehen sowie ein gemeinsamer Primärstrahleiter STPFS. Dargestellt sind separate Strahleiter und Detektoren DEF, STSF und DES, STSS für die LSM- und FCS-Detektion. Vorteilhaft können die Detektoren DEF und DES baugleich sein. Der Meß- und Auswertemodus kann mittels der Kontrolleinheit CU gewählt werden.

Die vorteilhafte Anordnung ergibt sich durch die gemeinsame Lokalisation der LSM- und der FCS-Detektionskanälen in einer Einheit. Ähnlich dem Aufbau, der in Bild 1 beschrieben wurde, wird Laserlicht einer oder mehrerer Wellenlängen mit Hilfe einer Kollimationsoptik und des primären Strahleiters durch eine Scaneinheit in die Probe fokussiert. Ein besonderer Vorteil dieses Aufbaus ist, daß auch der Meßort für die FCS-Messung mit Hilfe der Scanner gewählt werden kann. Insbesondere ist es dadurch möglich, die FCS-Analysenmethode zu einem bildgebenden Verfahren (Scanning FCM: S-FCSM) vorteilhaft zu erweitern. Reflektiertes Licht und Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv aufgefangen, durchläuft wiederum die Scanner und wird von einem oder mehreren sekundären Strahleitern in einen oder mehrere LSM-Detektionskanäle oder FCS-Detektionskanäle umgeleitet. Dabei kann eine Trennung nach spektralen Eigenschaften oder Polarisationseigenschaften erfolgen. Das detektierte Licht induziert elektrische Signale die zur Kontrolleinheit mit angeschlossenem Computer nebst geeignetem Programm geleitet und dort zur FCS-Analyse bzw. zur Bildrekonstruktion verwendet werden.

Das Laser-Scanning-Mikroskop ist hier so modifiziert, daß es Komponenten und Auswerteverfahren enthält, die es erlauben, auch FCS-Messungen durchzuführen. Scankomponenten und FCS-Komponenten sind erfindungsgemäß so kombiniert, daß eine Strahleilung bzw. Strahlumschaltung, wie sie im Bild 1 dargestellt wurde, entfallen kann. Der Vorteil dieser Anordnung besteht darin, daß zur Durchführung der FCS-Analysen an den vorher ausgewählten Punkten keine Probenbewegungen mehr erforderlich sind, da der Meßort mit Hilfe der Scanner und durch vertikale Verstellung des Objektivs eingestellt werden kann.

Die wirkungsmäßige Verbindung der Betriebsmodi erfolgt, indem entweder direkt während des Scavorganges der Scanner angehalten wird und an dem hierdurch eingestellten Probenpunkte eine FCS- Auswertung verfolgt oder nach dem Scavor-

gang durch Einstellen der Spiegel oder Verstellen des Tisches bei stehenden Scannerspiegeln an bestimmten Punkten eine FCS Auswertung erfolgt

Durch die Anordnung gemäß Bild 2 sind FCS-Messungen mit hoher Positioniergenauigkeit in kürzerer Folge möglich. Dieser vorgeschlagene Aufbau stellt ein scannendes Fluoreszenz-Korrelations-Mikroskop (S-FCM) dar, welches erfindungsgemäß sowohl strukturelle als auch biochemische Informationen bildhaft darstellen kann.

Patentansprüche

1.

Einrichtung zur Detektion von Fluoreszenzlicht mit wenigstens einer bildgebenden Mikroskopeeinheit und wenigstens einer Gerätekomponente zur Analyse molekularer Wechselwirkungen in kleinen Volumina, gekennzeichnet dadurch, daß

- Meßorte für die Analyse molekularer Wechselwirkung mit Hilfe des bildgebenden Verfahrens mindestens zweidimensional bestimmt und ausgewählt werden
- sowohl die bildgebende Mikroskopeinheit als auch die Gerätekomponente mit einer gemeinsamen Steuereinheit betrieben werden,
- und über die Steuereinheit und einen Computer mindestens die Analysenergebnisse der Gerätekomponente bildhaft dargestellt werden.

2. Einrichtung nach Anspruch 1, wobei die Analysenergebnisse dem Bild der bildgebenden Mikroskopeinheit zugeordnet werden.

3.

Einrichtung nach Anspruch 1 oder 2 wobei die Analyse molekularer Wechselwirkungen mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) erfolgt und die Einheit zur Bildgebung auf dem Prinzip der Laser-Scanning-Mikroskopie beruht.

4.

Einrichtung nach einem der Ansprüche 1-3 wobei die Auswahl des Probenortes für die FCS-Messung mit Hilfe eines verfahrbaren Probentisches und/oder vertikaler Verstellung des Objektives manuell und/ oder automatisch erfolgt

5.

Einrichtung nach einem der Ansprüche 1-4, wobei die Auswahl des Probenortes manuell und/ oder automatisch für die FCS-Messung mit Hilfe von mindestens einem Scanner erfolgt.

6.

Einrichtung zur Detektion des von einer beleuchteten Probe kommenden Lichtes, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-5 bestehend aus einem Laser- Sanning- Mikroskop (LSM) und einer in den Beleuchtungstrahlengang des LSM zwischen dem Scanner des LSM und der Probe eingekoppelten Anordnung zur Anregung und Erfassung von FCS über eine gemeinsame Auswerteeinheit.

7.

Einrichtung zur Detektion des von einer beleuchteten Probe kommenden Lichtes, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-5, bestehend aus einem Laser- Sanning- Mikroskop (LSM), wobei dem Scanner des LSM in Richtung der Detektion neben den LSM- Detektoren weitere Detektoren zur Erfassung von FCS - Signalen nachgeordnet sind und/ oder die Betriebsweise der LSM Detektoren von einer gemeinsamen Steuereinheit auf FCS Auswertung umgeschaltet wird.

8.

Verfahren zur Detektion des von einer beleuchteten Probe kommenden Lichtes, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-7 , wobei die Probe punktweise mindestens zweidimensional mit Beleuchtungslicht abgescannt und das von der Probe kommende Licht über mindestens einen ersten Detektor detektiert wird und während des Scavorganges und / oder nach dem Scanvorgang für mindestens einen Probenpunkt eine FCS - Auswertung erfolgt

9.

Verfahren nach Anspruch 8 wobei für mindestens einen Probenpunkt eine Abspeicherung und speichermäßige Zuordnung sowohl des beim Scannen detektierten Wertes als mindestens eines bei der FCS-Auswertung detektierten Wertes erfolgt.

10.

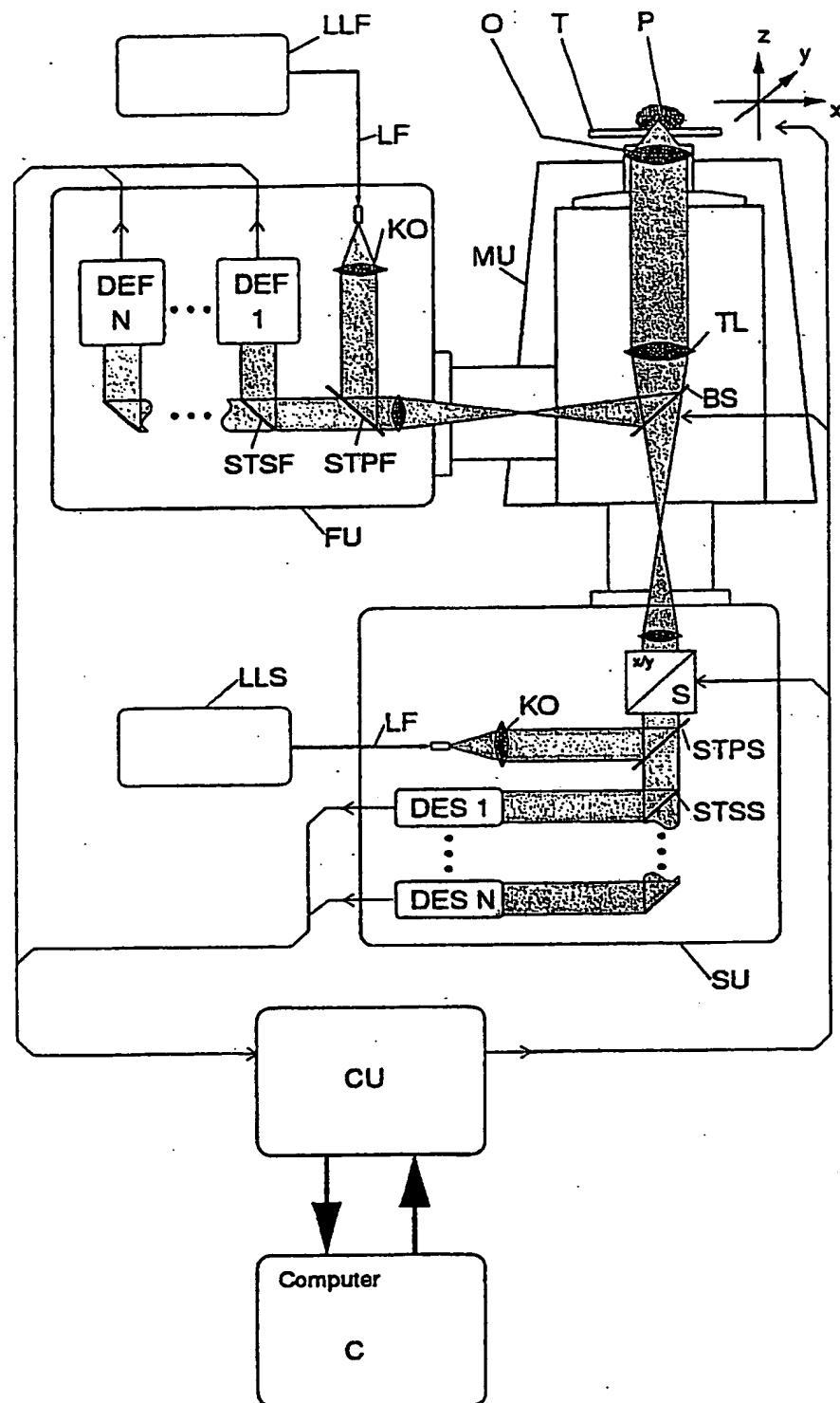
Verfahren nach Anspruch 8 oder 9 wobei die obenstehenden Verfahrensschritte für mehrere automatisch und/ oder manuell vorgewählte Probenpunkte erfolgen

11.

Verfahren nach einem der Ansprüche 8-10, wobei Mittel zur gemeinsamen bildlichen Darstellung der beim Scannen und bei der FCS-Auswertung ermittelten Werte vorgesehen sind.

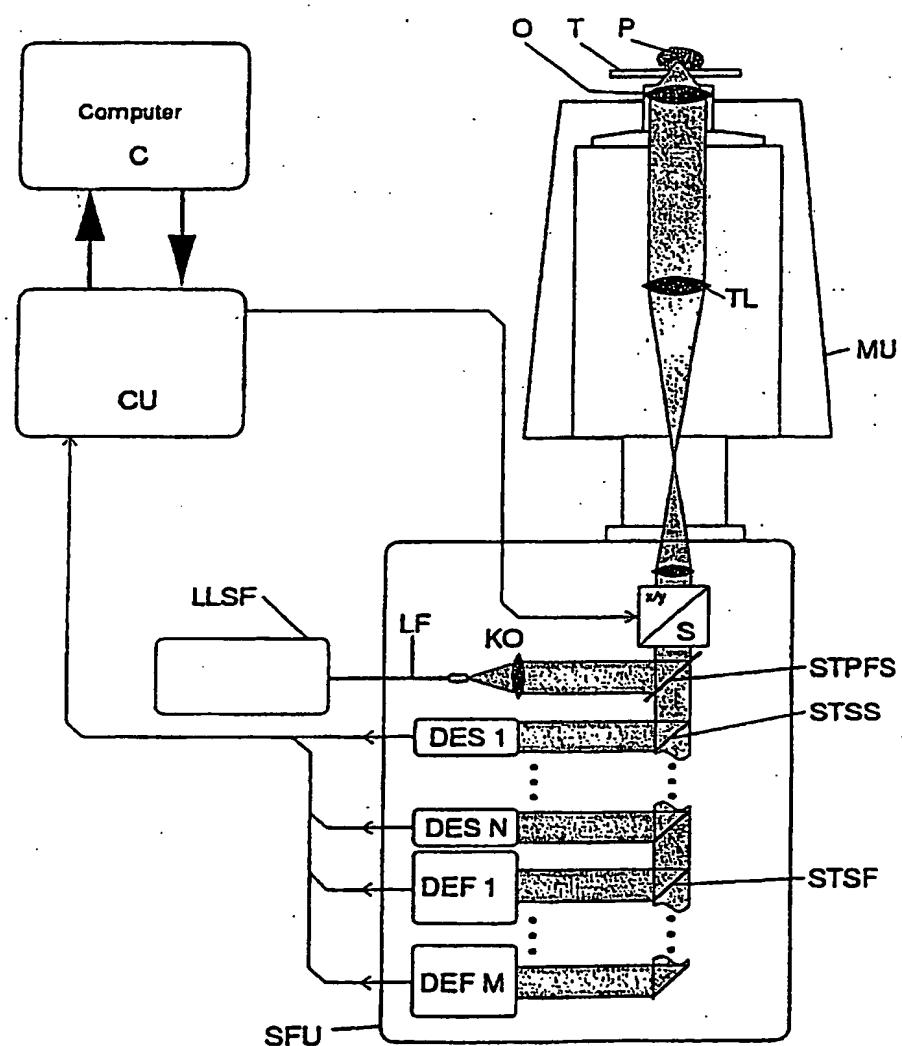
1/2

Bild 1



2/2

Bild2



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01663

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 GO1N21/64 GO2B21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 GO1N GO2B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 94 16313 A (EIGEN MANFRED ; HENCO KARSTEN (DE); RIGLER RUDOLF (DE); EVOTEC BIOS) 21. Juli 1994 (1994-07-21) Seite 47, Absatz 3 - Absatz 4 Seite 80, Absatz 4 - Seite 82, Absatz 1; Abbildung 10	1,8
A	Seite 47, Absatz 3 - Absatz 4 Seite 80, Absatz 4 - Seite 82, Absatz 1;	2-6,9-11
Y	PETERSEN N O ET AL: "Quantitation of membrane receptor distributions by image correlation spectroscopy: concept and application" BIOPHYSICAL JOURNAL, SEPT. 1993, USA, Bd. 65, Nr. 3, Seiten 1135-1146, XP001000182 ISSN: 0006-3495 Seite 1136, Spalte 2, Absatz 8 -Seite 1135, Spalte 1, Absatz 4	1,8
A	Seite 1136, Spalte 2, Absatz 8 -Seite 1135, Spalte 1, Absatz 4	2-7,9-11
		-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *'A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *'E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *'L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *'O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *'T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *'X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *'Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *'B" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
22. Juni 2001	05/07/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Stuebner, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Jonales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01663

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WISEMAN P W ET AL: "Dynamic image correlation spectroscopy (ICS) and two-color image cross-correlation spectroscopy (ICCS): concepts and application" THREE-DIMENSIONAL AND MULTIDIMENSIONAL MICROSCOPY: IMAGE ACQUISITION PROCESSING VII, SAN JOSE, CA, USA, 23-24 JAN. 2000, Bd. 3919, Seiten 14-20, XP001005572 Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering, 2000, SPIE-Int. Soc. Opt. Eng, USA ISSN: 0277-786X Seite 14 -Seite 15, Absatz 3	1,8
Y	HONG QIAN ET AL: "ANALYSIS OF CONFOCAL LASER-MICROSCOPE OPTICS FOR 3-D FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY" APPLIED OPTICS, US, OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, WASHINGTON, Bd. 30, Nr. 10, 1. April 1991 (1991-04-01), Seiten 1185-1195, XP000202077 ISSN: 0003-6935	1,8
A	siehe kapitel II, VIII und X	2-7,9-11
Y	DIASPRO A ET AL: "Three-dimensional fluorescence microscopy in two-photon excitation regime" PROCEEDINGS OF THE FIRST JOINT BMES/EMBS CONFERENCE. 1999 IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY 21ST ANNUAL CONFERENCE AND THE 1999 ANNUAL FALL MEETING OF THE BIOMEDICAL ENGINEERING SOCIETY (CAT. NO.99CH37015), PROCEEDINGS OF THE FIRST JOINT BMES/, Seite 1093 vol.2 XP001005601 1999, Piscataway, NJ, USA, IEEE, USA ISBN: 0-7803-5674-8 ganzes dokument	1,8
Y	US 5 079 169 A (CHU STEVEN ET AL) 7. Januar 1992 (1992-01-07)	1,8
A	Spalte 3, Zeile 53 - Zeile 62 Spalte 5, Zeile 22 - Zeile 53 Spalte 10, Zeile 46 - Zeile 60; Abbildung 1	2-4

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01663

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9416313 A	21-07-1994	DE 4301005 A AT 164943 T AU 5884394 A DE 59405644 D DK 679251 T EP 0679251 A ES 2116578 T JP 11502608 T	21-07-1994 15-04-1998 15-08-1994 14-05-1998 25-01-1999 02-11-1995 16-07-1998 02-03-1999
US 5079169 A	07-01-1992	KEINE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/01663

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 G01N21/64 G02B21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 G01N G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94 16313 A (EIGEN MANFRED ; HENCO KÄRSTEN (DE); RIGLER RUDOLF (DE); EVOTEC BIOS) 21 July 1994 (1994-07-21)	1,8
A	page 47, paragraph 3 - paragraph 4 page 80, paragraph 4 - page 82, paragraph 1; figure 10	2-6,9-11
Y	PETERSEN N O ET AL: "Quantitation of membrane receptor distributions by image correlation spectroscopy: concept and application" BIOPHYSICAL JOURNAL, SEPT. 1993, USA, vol. 65, no. 3, pages 1135-1146, XP001000182 ISSN: 0006-3495	1,8
A	page 1136, column 2, paragraph 8 - page 1135, column 1, paragraph 4	2-7,9-11
		-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 2001

Date of mailing of the International search report

05/07/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Stuebner, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/01663

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WISEMAN P W ET AL: "Dynamic image correlation spectroscopy (ICS) and two-color image cross-correlation spectroscopy (ICCS): concepts and application" THREE-DIMENSIONAL AND MULTIDIMENSIONAL MICROSCOPY: IMAGE ACQUISITION PROCESSING VII, SAN JOSE, CA, USA, 23-24 JAN. 2000, vol. 3919, pages 14-20, XP001005572 Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering, 2000, SPIE-Int. Soc. Opt. Eng, USA ISSN: 0277-786X page 14 -page 15, paragraph 3	1,8
Y	HONG QIAN ET AL: "ANALYSIS OF CONFOCAL LASER-MICROSCOPE OPTICS FOR 3-D FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY" APPLIED OPTICS, US, OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, WASHINGTON, vol. 30, no. 10, 1 April 1991 (1991-04-01), pages 1185-1195, XP000202077 ISSN: 0003-6935	1,8
A	see Chapters II, VIII and X	2-7,9-11
Y	DIASPRO A ET AL: "Three-dimensional fluorescence microscopy in two-photon excitation regime" PROCEEDINGS OF THE FIRST JOINT BMES/EMBS CONFERENCE. 1999 IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY 21ST ANNUAL CONFERENCE AND THE 1999 ANNUAL FALL MEETING OF THE BIOMEDICAL ENGINEERING SOCIETY (CAT. NO.99CH37015), PROCEEDINGS OF THE FIRST JOINT BMES/, page 1093 vol.2 XP001005601 1999, Piscataway, NJ, USA, IEEE, USA ISBN: 0-7803-5674-8 whole document	1,8
Y	US 5 079 169 A (CHU STEVEN ET AL) 7 January 1992 (1992-01-07)	1,8
A	column 3, line 53 - line 62 column 5, line 22 - line 53 column 10, line 46 - line 60; figure 1	2-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/01663

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9416313	A 21-07-1994	DE 4301005 A		21-07-1994
		AT 164943 T		15-04-1998
		AU 5884394 A		15-08-1994
		DE 59405644 D		14-05-1998
		DK 679251 T		25-01-1999
		EP 0679251 A		02-11-1995
		ES 2116578 T		16-07-1998
		JP 11502608 T		02-03-1999
US 5079169	A 07-01-1992	NONE		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.